

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 9 月 25 日 (25.09.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/078622 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 14/195, C12N 1/21, C12J 1/04
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02731
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 7 日 (07.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-73115 2002 年 3 月 15 日 (15.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ミツカングループ本社 (MITSUKAN GROUP CORPORATION) [JP/JP]; 〒475-8585 愛知県 半田市 中村町 2 丁目 6 番地 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後藤 英嗣 (GOTO, Hidetsugu) [JP/JP]; 〒475-0836 愛知県 半田市 青山 1-7-3 Aichi (JP). 中野 繁 (NAKANO, Shigeru) [JP/JP]; 〒470-2212 愛知県 知多郡 阿久比町 卯坂 坂部 2 8 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 戸田 親男 (TODA, Chikao); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門 1-19-1 4 邦楽ビル 503 戸田特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SI, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SQUALENE-HOPENE CYCLASE GENE OF ACETIC ACID BACTERIUM, ACETIC ACID BACTERIUM BRED WITH THE USE OF THE GENE, AND PROCESS FOR PRODUCING VINEGAR USING THE ACETIC ACID BACTERIUM

(54) 発明の名称: 酢酸菌のスクアレン-ホペンサイクラゼ遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

(57) Abstract: A novel acetic acid bacterium-origin gene participating in acetic acid-tolerance; a method of improving the acetic acid-tolerance of a microorganism, in particular, an acetic acid bacterium, using this gene; and a process of efficiently producing a vinegar having an elevated acetic acid concentration with the use of the acetic acid bacterium having the thus improved acetic acid tolerance. From a chromosomal DNA library of an acetic acid bacterium, a gene enabling the growth of the acetic acid bacterium in a medium containing acetic acid at such a high concentration as not allowing the growth in usual is obtained. By using this method, a novel gene participating in acetic acid-tolerance is cloned from an acetic acid bacterium for practical use belonging to the genus *Gluconacetobacter*. A transformant constructed by transferring this gene into an acetic acid bacterium has a remarkably improved acetic acid-tolerance. When this transformant is cultured under aeration in the presence of ethanol, the growth induction period is shortened and the growth speed and the acid-forming speed are elevated. Moreover, the final carryover acetic acid level thereof can be remarkably elevated thereby.

(57) 要約: 本発明は、酢酸菌由来の酢酸耐性に関与する新規な遺伝子、該遺伝子を用いて微生物、特に酢酸菌の酢酸耐性を向上させる方法、及び酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供する。本発明においては、酢酸菌の染色体 DNA ライブラリーから、通常は増殖できない濃度の酢酸を含有する培地でも増殖を可能にさせる機能を有する遺伝子を取得する方法によって、グルコンアセトバクター属に属する実用酢酸菌から、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子をクローニングした。また、該遺伝子を酢酸菌に導入してなる形質転換株においては、顕著に酢酸耐性が向上し、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮し、増殖速度、生酸速度が向上し、さらに最終到達酢酸濃度を顕著に向上させることが可能となった。

WO 03/078622 A1

## 明 細 書

酢酸菌のスクアレンーホペンサイクラーゼ遺伝子、該遺伝子を用いて  
育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

### 発明の属する技術分野

本発明は、微生物に由来する酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、このコピー数を増幅した微生物、特にアセトバクター属（*Acetobacter*）及びグルコンアセトバクター属（*Gluconacetobacter*）に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率良く製造する方法に関する。

### 従来の技術

酢酸菌は食酢製造に広く利用されている微生物であり、特にアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌が工業的な酢酸発酵に利用されている。

酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換され、その結果、酢酸が培地中に蓄積することになるが、酢酸は酢酸菌にとっても阻害的であり、酢酸の蓄積量が増大して培地中の酢酸濃度が高くなるにつれて酢酸菌の増殖能力や発酵能力は次第に低下する。

そのため、酢酸発酵においては、より高い酢酸濃度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち酢酸耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、酢酸耐性に関与する遺伝子（酢酸耐性遺伝子）をクローニングし、その酢酸耐性遺伝子を用いて酢酸菌を育種、改良することが試みられている。

これまでの酢酸菌の酢酸耐性遺伝子に関する知見としては、アセトバクター属の酢酸菌の酢酸耐性を変異させて酢酸感受性にした株を元の耐性に回復させるこ

とのできる相補遺伝子として、クラスターを形成する3つの遺伝子（*aarA*、*aarB*、*aarC*）がクローニングされていた（例えば、非特許文献1参照）。

この内、*aarA*遺伝子はクエン酸合成酵素をコードする遺伝子であり、又、*aarC*遺伝子は酢酸の資化に関係する酵素をコードする遺伝子であると推定されたが、*aarB*遺伝子については機能が不明であった（例えば、非特許文献2参照）。

これらの3つの酢酸耐性遺伝子を含む遺伝子断片をマルチコピープラスミドにクローニングし、アセトバクター・アセチ・サブスベシース・ザイリナム IF03288 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IF03288) 株に形質転換して得られた形質転換株は、酢酸耐性の向上レベルが僅かであり、また実際の酢酸発酵での能力の向上の有無については不明であった（例えば、特許文献1参照）。

一方、酢酸菌からクローニングされた膜結合型アルデヒド脱水素酵素（ALDH）をコードする遺伝子を酢酸菌に導入することによって、酢酸発酵において最終到達酢酸濃度の向上が認められた例が開示されている（例えば、特許文献2参照）。しかし、ALDHはアルデヒドを酸化する機能を有する酵素であって酢酸耐性に直接関係する酵素ではないことから、ALDHをコードする遺伝子が真に酢酸耐性遺伝子であるとは断定できないものであった。

#### 特許文献1

特開平3-219878号公報

#### 特許文献2

特開平2-2364号公報

#### 特許文献3

特開昭60-9489号公報

#### 特許文献4

特開昭60-9488号公報

#### 非特許文献1

「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー（*Journal of Bacteriology*）」、17

2 卷, 2 0 9 6 - 2 1 0 4 , 1 9 9 0 年」

非特許文献 2

「ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering) , 7 6 巻, 2 7 0 - 2 7 5 頁, 1 9 9 3 年」

非特許文献 3

「マイクロバイオロジー (Microbiology) , 1 4 3 巻, 1 2 3 5 - 1 2 4 2 , 1 9 9 7 年」

非特許文献 4

「アプライド・オブ・エンバイロメト・アンド・マイクロバイオロジー (Applied of Environment and Microbiology) 5 5 巻, 1 7 1 - 1 7 6 , 1 9 8 9 年」

非特許文献 5

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry) , 5 2 巻, p. 3 1 2 5 - 3 1 2 9 , 1 9 8 8 年」

非特許文献 6

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry) , 4 9 巻, p. 2 0 9 1 - 2 0 9 7 , 1 9 8 5 年」

非特許文献 7

「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry) , 5 8 巻, p. 9 7 4 - 9 7 5 , 1 9 9 4 年」

非特許文献 8

「カナディアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー・アンド・フィジオロジー (Canadian Journal of Biochemistry and Physiology) , 3 7 巻, 9 1 1 - 9 1 7 , 1 9 5 9 年」

非特許文献 9

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry) , 2 2 6 巻, 4 9 7 - 5 0 9 , 1 9 5 7 年」

## 非特許文献 10

「ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry), 272巻, 9809-9817, 1997年」

## 非特許文献 11

「ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 98巻, 327-331, 1985年」

## 発明が解決しようとする課題

以上のように、従来より酢酸菌の酢酸耐性を遺伝子レベルで解明し、高い酢酸耐性を有する実用酢酸菌の開発に成功した例は報告されていない。しかし、酢酸耐性にすぐれた酢酸菌が開発されれば、従来よりも高濃度の酢酸発酵が行われ、高濃度酢酸もろみ、高濃度食酢の効率的製造が可能となることから、本発明者らは、再度、酢酸菌の酢酸耐性の向上を遺伝子レベルで解明することとした。

そして本発明者らは、各方面から検討した結果、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有するタンパク質をコードする新規な酢酸耐性遺伝子を取得し、また取得した酢酸耐性遺伝子を用いて、より強い酢酸耐性を有する酢酸菌を育種することが重要であるとの観点にたち、酢酸菌に属する微生物由来の酢酸耐性に関与する新規なスクアレンーホペンサイクラーゼ遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の酢酸耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の酢酸耐性を向上させる方法、さらに酢酸耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供することを新規技術課題として新たに設定した。

## 課題を解決するための手段

本発明者らは、酢酸存在下でも増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な酢酸耐性に関与する遺伝子が存在するとの仮説を立て、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の酢酸耐性を向上させることができ、さらには高濃度の酢酸を含有する従来得ることができなかった新規

食酢の効率的な製造法を開発することが可能になるとの新規着想を得た。

従来の酢酸耐性遺伝子の取得方法は、酢酸菌の酢酸感受性の変異株を相補する遺伝子をクローニングする方法などが一般的であった。

しかし、このような方法では産業上有用な酢酸耐性遺伝子を見出すことは困難であると考え、鋭意検討した結果、本発明者らは、酢酸菌から酢酸耐性遺伝子を見出す方法として、酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、この染色体DNAライブラリーを酢酸菌に形質転換し、通常寒天培地上で1%の酢酸の存在下でしか生育できない株を、2%の酢酸の存在下でも生育可能にする遺伝子をスクリーニングすることによって取得する方法を開発した。

この方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクター属の酢酸菌から、酢酸耐性を実用レベルで向上させる機能を有する新規な酢酸耐性遺伝子をクローニングすることにはじめて成功した。

得られた酢酸耐性遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbank検索の結果、根粒菌などで見出されているスクアレニーホペンサイクラーゼと称される一群のタンパク質の遺伝子とある程度の相同性を示し、酢酸菌のスクアレニーホペンサイクラーゼをコードする遺伝子であると推定された。

また、アミノ酸配列レベルでSWISS-PROT/PIRで検索した結果からも、スクアレニーホペンサイクラーゼ中に保存されるモチーフ(DXDDTA)(例えば、非特許文献3参照)を有しており、酢酸菌のスクアレニーホペンサイクラーゼをコードする遺伝子であると考えられた。

しかし、取得された酢酸菌のスクアレニーホペンサイクラーゼ遺伝子は、根粒菌などの他の微生物で見出されている既知のスクアレニーホペンサイクラーゼ遺伝子とは相同性がきわめて低かったことから、他のスクアレニーホペンサイクラーゼ遺伝子とある程度は似ているものの酢酸菌に特異的な新規タンパク質(以下、タンパク質SHCということもある)をコードする新規遺伝子であることを見出した。

また、該遺伝子をプラスミドベクターに連結して酢酸菌に形質転換し、コピー数を増幅させた形質転換株においては、その脂質組成において代謝産物であるテ

トラヒドロキシバクテリオホパンの組成比が増大することから、該遺伝子が酢酸菌のスクアレンーホペンサイクラーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子であることが確認されると同時に、顕著に酢酸耐性が向上することが確認された。

さらに、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、増殖誘導期が短縮する上に、増殖速度、生酸速度が向上し、さらに最終到達酢酸濃度が顕著に向上することなどを見出し、更に該タンパク質のアミノ酸配列、およびそれをコードする遺伝子DNAの塩基配列の決定にも成功し、本発明を完成するに至った。

#### 図面の簡単な説明

##### 図 1

BamHIを用いてクローニングされたグルコンアセトバクター・エンタニ由来の遺伝子断片（pB1）の制限酵素地図とSHC遺伝子の位置、及びpSHCへの挿入断片の概略図。

##### 図 2

SHC遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の培養経過を示す図面。

##### 図 3

SHC遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の温度変化と酢酸発酵経過を示す図面。

##### 図 4

本酢酸耐性遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列（配列番号2）を示す。

##### 図 5

同上続きを示す。

##### 図 6

プライマー1を示す。

## 図 7

プライマー 2 を示す。

すなわち本発明の実施態様は、下記のとおりである。

(1) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S H C。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(2) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S H C をコードする遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(3) 下記の (a)、又は (b) に示す DNA である上記 (2) に記載の遺伝子の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 4 0 6 ~ 2 4 3 6 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 4 0 6 ~ 2 4 3 6 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

(4) 上記 (2)、又は (3) に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

(5) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記 (4) に記載の微生物。



(6) 上記(4)、又は(5)に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法、及び、それによって得られた酢酸含量が高い(10～16%)新規な食酢。

(7) 少なくとも上記(2)、又は(3)に記載のDNAを含んだ組換えプラスミドpUSHC(FERM BP-7933)。

(8) 少なくとも配列表の配列番号1に示す塩基配列を有するDNA断片を含んでなる組換えプラスミドであって、例えば、酢酸菌—大腸菌シャトルベクター(マルチコヒーベクター) pMV24にこのDNA断片を挿入してなるプラスミドpSHC、及び/又は、このプラスミドpSHCをアセトバクター・アセチ(Acetobacter aceti) No. 1023(FERM BP-2287)に導入してなる形質転換体。

本発明によれば、微生物に対して、酢酸に対する耐性を付与し、増強することができる。そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、酢酸に対する耐性が顕著に向上し、培地中に高濃度の酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

#### 発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

##### (1) 本発明のDNA

本発明のDNAは、スクアレン—ホペンサイクラーゼ遺伝子の活性領域を持ち、スクアレン—ホペンサイクラーゼ活性を有し、且つ酢酸耐性を向上させる機能を有する配列表の配列番号2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし得る塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含む。

本発明のDNAは、グルコンアセトバクター・エンタニイ(Gluconacetobacter entanii)の染色体DNAから次のようにして取得することができる。まず、グルコンアセトバクター・エンタニイ、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24(Acetobacter altoacetigenes MH-24)株(FERM BP-49

1) の染色体DNAライブラリーを調製する。なお、染色体DNAは、例えば特許文献3に開示された方法により取得する。

次に、得られた染色体DNAから酢酸耐性遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の断片混合物を得る。切断反応時間などを調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。例えば、Sau3AIを温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間(1分～2時間)、染色体DNAに作用させてこれを消化する。なお、後記実施例ではBamHIを用いた。

次いで、切断された染色体DNA断片を、酢酸菌内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素BamHIと相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えばBamHIを温度30℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で、1時間以上ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。

次に、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と切断開裂されたベクターDNAを混合し、これにT4DNAリガーゼを温度4～16℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で1時間以上、好ましくは6～24時間作用させて組換えDNAを得る。

得られた組換えDNAを用いて、通常は寒天培地上で1%までの酢酸濃度でしか増殖することのできない酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチ1023株(Acetobacter aceti No.1023)株(FERM BP-2287)を形質転換し、2%酢酸含有寒天培地に塗布して、培養する。生じたコロニーを液体培地に接種して培養し、得られる菌体からプラスミドを回収することで酢酸耐性遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

本発明のDNAとして、具体的には、配列表の配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられるが、その内、塩基番号406～2436からなる塩基配列はコーディング領域である。

配列番号1に示す塩基配列及び配列番号2に示すアミノ酸配列(図4、図5：

塩基番号 406～2436 に対応) は、DDBJ/EMBL/Genbank 及び SWISS-PROT/PIR においてホモロジー検索をしたところ、アミノ酸配列レベルでブラディリゾビウム・ジャポニカム (*Bradyrhizobium japonicum*) の SHC 遺伝子と 54.2%、リゾビウム・スピシーズ (*Rizobium* sp) の SHC 遺伝子とも 53.5% の相同性を有することが分かったが、いずれも 50% 台の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。なお、上記の SHC 遺伝子は、酢酸耐性と関係していることは全く知られていない。

さらに、本発明の DNA は、すでに取得されている酢酸菌の酢酸耐性遺伝子 (*aarA*、*aarB*、*aarC*) や酢酸耐性を増強する機能を有する ADH 遺伝子などとも異なる新規な酢酸耐性を増強する機能を有する遺伝子であると同定された。

本発明の DNA は、その塩基配列が明らかとなったので、例えば、鋳型として酢酸菌 *グルコンアセトバクター・エンタニイ* のゲノム DNA を用い、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR 反応) によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々の DNA 合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR 反応は、アプライドバイオシステムズ社 (Applied Biosystems) 製のサーマルサイクラー Gene Amp PCR System 2400 を用い、Taq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製) や KOD-Plus (東洋紡績社製) などを使用して、定法に従って行なうことができる。

本発明の酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA は、コードされるタンパク質の酢酸耐性を増強する機能が損なわれない限り、1 又は複数の位置で 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

このような酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタン

パク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加又は逆位されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から得ることが可能である。

具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号406～2436からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1% SDSに相当する塩濃度で60℃で洗浄が行われる条件などが挙げられる。

## (2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌を指し、酢酸耐性が増強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属細菌である。

アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ(Acetobacter

aceti) が挙げられ、アセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターに FERM BP-2287 として寄託) が例示される。

また、グルコンアセトバクター属細菌としては、グルコンアセトバクター・エントニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、現在特許生物寄託センターに FERM BP-491 として寄託されているアセトバクター・アルトアセチゲネス MH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株が例示される。

酢酸耐性の増強は、例えば酢酸耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含む DNA 断片をアセトバクター属細菌中で効率よく機能するプロモーター配列に連結して得られる組換え DNA を用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって増強することができる。

また、染色体 DNA 上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば大腸菌のプラスミド pBR322 のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミド pACYC177 のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミド pACYC184 のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによって、酢酸耐性を増強することができる。

該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

マルチコピーベクターとしては、pMV24 (例えば、非特許文献 4 参照) や pTA5001 (A)、pTA5001 (B) (例えば、特許文献 4 参照) などが挙げられ、染色体組み込み型ベクターである pMVL1 (例えば、非特許文献 5 参照) も挙げられる。また、トランスポゾンとしては、Mu や IS1452 などが挙げられる。

アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法（例えば、非特許文献6参照）やエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献7参照）等によって行なうことができる。

アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその酢酸耐性を増強すると、酢酸の生産量や生産効率を増大させることができる。

### （３）食酢製造法

上記のようにして、酢酸耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより酢酸耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌であってアルコール酸化能を有するものを、アルコール含有培地で培養し、該培地中に酢酸を生産蓄積せしめることにより、食酢を効率よく製造することができる。

本発明の製造法における酢酸発酵は、従来の酢酸菌の発酵法による食酢の製造法と同様に行なえば良い。酢酸発酵に使用する培地としては、炭素源、窒素源、無機物、エタノールを含有し、必要があれば使用菌株が生育に要求する栄養源を適量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。

炭素源としては、グルコースやシュクロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸が挙げられる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

また、培養は、静置培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法等の好氣的条件下で行ない、培養温度は通常30℃で行なう。培地のpHは通常2.5～7の範囲であり、2.7～6.5の範囲が好ましく、各種酸、各種塩基、緩衝液等によって調製することもできる。通常1～21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸が蓄積する。

### （４）本発明の実施態様

また、本発明に係るORF又はそれを含有する酢酸耐性遺伝子（配列番号1）を大腸菌ベクターpUC19に挿入してなる組換えプラスミドpUSHCは、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6の独立行政法人 産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM BP-7933として平成14年（20

02年) 3月1日に寄託されているので、本発明に係る遺伝子のDNAはこの組換えプラスミドから容易に入手することができ、当業者であれば本発明の実施は容易である。そして、所望するのであれば、常法にしたがって、SHC遺伝子を取り出して適当なベクターに挿入し、これを酢酸菌に導入し、これを培養することにより酢酸含量の高い食酢を容易に製造することができる。

更にまた、上記したようにそしてまた後記する実施例からも明らかなように、酢酸耐性遺伝子源の寄託番号、PCRの態様、プラスミドベクター、組換えプラスミドの作製、宿主菌の寄託番号その他が具体化され明らかにされており、いずれも、入手ないし操作、処理が容易であるので、本明細書に記載した実施例にしたがって各操作、処理を行えば、目的とする酢酸耐性形質転換体を得ることができ、これを使用することによって高濃度の酢酸を含む食酢を製造することができる。したがって、この点からしても、本発明の実施は容易である。

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

#### 実施例

(実施例1) グルコンアセトバクター・エンタニイからの酢酸耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

##### (1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を6%酢酸、4%エタノールを添加したYPG培地 (3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン) で30℃にて振とう培養を行なった。培養後、培養液を遠心分離 (7,500×g、10分) し、菌体を得た。得られた菌体より、特許文献3に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

上記のようにして得られた染色体DNA及び大腸菌-酢酸菌シャトルベクターpMV24を、制限酵素BamHI (宝酒造社製) で切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット (TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2,

宝酒造社製)を用いて連結してグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを構築した。

## (2) 酢酸耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたグルコンアセトバクター・エンタニイの染色体DNAライブラリーを、通常は寒天培地上で酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株に形質転換し、2%酢酸、100  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むYPG寒天培地にて、30℃で4日間培養した。

生じたコロニーを100  $\mu$ g/mlのアンピシリン含むYPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収したところ、図1に示した約5 kbpのBamHI断片がクローン化されたプラスミドが回収でき、このプラスミドをpB1と命名した。さらに2%酢酸を含有するYPG寒天培地でアセトバクター・アセチNo. 1023株を生育可能にするDNA断片は、pB1にクローン化された約5 kbpのBamHI断片中の約2.7 kbpのBamHI-PstI断片であることが確認できた。

このようにして通常は寒天培地上で酢酸濃度1%程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株を2%酢酸含有寒天培地でも増殖可能にする酢酸耐性遺伝子断片を取得した。

## (3) クローン化されたDNA断片の塩基配列の決定

上記のクローン化されたBamHI-PstI断片を大腸菌ベクターpUC19のBamHI-PstI部位に挿入した組換えプラスミドpUSHC(FERM BP-7933)を作製した。このプラスミドを用いて、クローン化されたBamHI-PstI断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した。その結果、配列番号1に記載した塩基配列が決定された。配列決定は両方のDNA鎖の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様にして行なった。

配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号406から塩基番号2436にかけて、配列番号2に記載したような677個のアミノ酸(図4、図5)をコードするオープンリーディング・フレーム(ORF)の存在が確認され、スクアレン



ーホペンサイクラーゼの活性保存領域であるDXDDTAモチーフも、アミノ酸番号415からアミノ酸番号420にかけて存在する事が確認され、この遺伝子をSHC遺伝子と命名した。

(実施例2) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) 由来の酢酸耐性遺伝子を含むDNA断片をPCR法により増幅し、その結果得られた増幅断片をBamHI-EcoRIで切断し、この断片を酢酸菌-大腸菌シャトルベクターpMV24 (例えば、非特許文献4参照) の制限酵素BamHI-EcoRI切断部位に挿入したプラスミドpSHCを作製した。pSHCに挿入された増幅断片の概略を図1に示した。

PCR法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1 (その塩基配列を配列番号3 (図6) に示す) 及びプライマー2 (その塩基配列を配列番号4 (図7) に示す) を用い、下記するPCR条件にて、PCR法を実施した。

PCR条件は、94℃ 15秒、60℃ 30秒、68℃ 2分を1サイクルとして、30サイクル行なった。

このpSHCをアセトバクター・アセチNo. 1023株にエレクトロポレーション法 (例えば、非特許文献7参照) によって形質転換した。形質転換株は100µg/mlのアンピシリン及び2%の酢酸を添加したYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、SHC遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

## (2) 形質転換株の酢酸耐性

上記のようにして得られたプラスミド p S H C を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、酢酸を添加した Y P G 培地での生育を、シャトルベクター p M V 2 4 のみを導入した元株アセトバクター・アセチ N o . 1 0 2 3 株と比較した。

具体的には、酢酸 3 %、エタノール 3 %、アンピシリン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む  $100 \text{ ml}$  の Y P G 培地にて、 $30^\circ\text{C}$  で振とう培養 ( $150 \text{ rpm}$ ) を行ない、形質転換株と元株の酢酸添加培地での生育を  $660 \text{ nm}$  における吸光度を測定することで比較した。

その結果、図 2 に示すように、元株と形質転換株は、酢酸を含有しないエタノール 3 % 添加 Y P G 培地ではほぼ同様の増殖を示したのに対して、3 % 酢酸と 3 % エタノールを添加した培地では形質転換株だけが増殖可能であり、元株アセトバクター・アセチ N o . 1 0 2 3 株では増殖できなかったことが確認でき、S H C 遺伝子の酢酸耐性増強機能が確認できた。

## (3) 形質転換株の温度耐性

前記 (1) で得られたプラスミド p S H C を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、培養温度を変化させた Y P G 培地での生育を、シャトルベクター p M V 2 4 のみを導入した元株アセトバクター・アセチ N o . 1 0 2 3 株と比較した。

具体的には、2 L のミニジャー (千代田製作所製 : T B R - 2 - 1) を用いて、酢酸 1 %、エタノール 4 %、アンピシリン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む 1 L の Y P G 培地にて、 $30^\circ\text{C}$ 、 $400 \text{ rpm}$ 、 $0.20 \text{ vvm}$  の通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度 3 % 程度まで発酵させた。その後、 $200 \text{ ml}$  の培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、新たに酢酸、エタノール、アンピシリン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含有する Y P G 培地を  $800 \text{ ml}$  添加し、酢酸 1 % でエタノール 4 % の濃度に調製して、培養温度は  $33^\circ\text{C}$  に上げて再び発酵を開始した。

さらに発酵が進行し、培地中の酢酸濃度が 3 % 程度になったところで、再び培養液の取り出しと、培地の再添加を行い、さらに培養温度を  $36^\circ\text{C}$  に上げて同様

に発酵させ、さらに同様にして、培養温度を1℃ずつ上げて酢酸発酵を実施した。

そして、菌体増殖を660nmにおける吸光度を測定し、酢酸発酵度合を培養液中の酢酸濃度を測定して、比較した。

その結果、図3に示すように、形質転換株では40℃での酢酸発酵、菌体増殖が可能であったのに対して、元株アセトバクター・アセチNo. 1023では37℃までしか酢酸発酵、菌体増殖は確認されず、SHC遺伝子の温度耐性増強機能が確認できた。

(実施例3) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来のSHC遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験と脂質分析

#### (1) 酢酸発酵試験

実施例2で得られたプラスミドpSHCを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpMV24のみを有する元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と酢酸発酵能を比較した。

具体的には、5Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-5A）を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン100μg/mlを含む2.5LのYPG培地にて、30℃、400rpm、0.20vvmの通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度3%まで発酵させた。その後、700mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った700mlに対して酢酸、エタノール、アンピシリン100μg/mlを含む1.8LのYPG培地を添加して、酢酸3%、エタノール4%の濃度に調製し、再び酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が1%を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表1にまとめた。

表1

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 (OD660/hr)	生産速度 (%/hr)	生育誘導期 (hr)
元株	9.5	0.0151	0.103	62.5
形質転換株	11.2	0.0487	0.131	16.0

表1の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生酸

速度、増殖誘導期の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

## (2) 菌体の脂質組成分析

プラスミド pSHC を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクター pMV24 のみを有する元株アセトバクター・アセチ No. 1023 と菌体の脂質組成を測定し、比較した。

具体的には、前記(1)において、元株で最終酸度 9.5% まで発酵させた発酵液と、形質転換株で最終酸度 11.2% まで発酵させた発酵液を、それぞれ遠心分離 (7,500×g、10 分間) して菌体を得た。得られた菌体を 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で 3 回洗浄した。その後直ちに、ブライダグヤー法 (例えば、非特許文献 8 参照) に従って全脂質を抽出した。

全脂質中のリン脂質リンはリン脂質-テストワコー (和光純薬工業社製) を用いて定量し、テトラヒドロキシバクテリオホバンは以下の方法に従って分析を行ない、リン脂質リン当たりの比で算出した。

すなわち、全脂質を 0.4 N のメタノール性水酸化ナトリウムに懸濁し、37℃ にて 2 時間保持した。反応物からフォルチ分配 (例えば、非特許文献 9 参照) で有機層を回収し、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、適量のクロロホルム-メタノール (2:1、v/v) 混液に溶解してアルカリ安定脂質を調製した。

このようにして得られたアルカリ安定脂質を Nagiec らの方法 (例えば、非特許文献 10 参照) でベンゾイル誘導体化処理し、Kito らの方法 (例えば、非特許文献 11 参照) で未反応物を除去した。

精製されたベンゾイル誘導体化物をロータリーエバポレーターで濃縮乾固後、ヘキサン-イソプロパノール (100:1.5、v/v) に溶解させて高速液体クロマトグラフィー分析 (島津製作所製; SHIMADZU LC-6A) に供した。カラムは LiChrospher 100 CN (Merck 社製; 4×250) を使い、ヘキサン-イソプロパノール (100:1.5、v/v) を流速 1 ml/min で溶出させ、検出波長は 230 nm とした。以上の分析結果を表 2 にまとめた。

〔表 2〕

	THBH / Pi
元 株	1. 0 0
形質転換株	1. 2 8

THBH：テトラヒドロキシバクテリオホパン

表 2 の結果から、形質転換株では、SHC の代謝産物である THBH が元株に対して 1. 2 8 倍高くなっており、クローニングした SHC 遺伝子はスクアレナーホペンサイクラーゼをコードすることが確認された。

(実施例 4) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の酢酸耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸耐性の増強

(1) アセトバクター・アルトアセトゲネスへの形質転換

実施例 2 で得られたプラスミド pSHC をグルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の 1 株であるアセトバクター・アルトアセトゲネス MH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) にエレクトロポレーション法 (例えば、非特許文献 7 参照) によって形質転換した。形質転換株は  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリン及び 4 % の酢酸と 4 % のエタノールを添加した 0. 5 5 % の寒天を含んだ YPG 寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、SHC 遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

(1) 酢酸発酵試験

実施例 2 で得られたプラスミド pSHC を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクター pMV24 のみを有する元株アセトバクター・アルトアセトゲネス MH-24 株と酢酸発酵能を比較した。

具体的には、5 L のミニジャー (三ツワ理化学工業社製 ; KMJ-5A) を用いて、酢酸 4 %、エタノール 4 %、アンピシリン  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  を含む 2. 5 L の YPG 培地にて、 $30^\circ\text{C}$ 、500 rpm、0. 20 vvm の通気攪拌培養を

行ない、酢酸濃度 6.3 % まで発酵させた。その後、700 ml の培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った 700 ml に対して酢酸、エタノール、アンピシリン 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む 1.8 L の YPG 培地を添加して、酢酸 5.5 %、エタノール 4 % の濃度に調製し、再び酢酸発酵を開始させ、途中培地中のエタノール濃度が 1 % を維持するようにエタノールを添加しつつ通気攪拌培養を継続して、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表 3 にまとめた。

表 3

	最終到達酢酸濃度 (%)	比増殖速度 (OD660/hr)	生酸速度 (%/hr)
元株	14.6	0.501	1.142
形質転換株	16.0	1.128	1.179

表 3 の結果から、形質転換株の方が、最終到達酢酸濃度、比増殖速度、生酸速度の何れにおいても、顕著に優れていることが確認できた。

#### 発明の効果

本発明により、酢酸耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高酢酸濃度の食酢を高効率で製造する方法が提供できた。

規則第 13 規則の 2 の寄託された微生物への言及

1. p U S H C

イ 当該微生物を寄託した寄託機関の名称及びあて名

名称 独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

あて名 〒305-8566 日本国茨城県つくば市

東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6

ロ イの寄託機関に寄託した日付

平成 14 年 (2002 年) 3 月 1 日

ハ イの寄託機関が寄託について付した受託番号

F E R M B P - 7 9 3 3

## 請 求 の 範 囲

1 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S H C。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

2 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 S H C をコードする遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質。

3 下記の (a)、又は (b) に示す DNA である請求項 2 に記載の遺伝子の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 406 ~ 2436 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 406 ~ 2436 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、酢酸耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

4 請求項 2、又は請求項 3 に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、酢酸耐性が増強された微生物。

5 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする請求項 4 に記載の微生物。

6 請求項 4、又は請求項 5 に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。



7 少なくとも請求項 2、又は請求項 3 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUSHC (FERM BP-7933)。

図 1

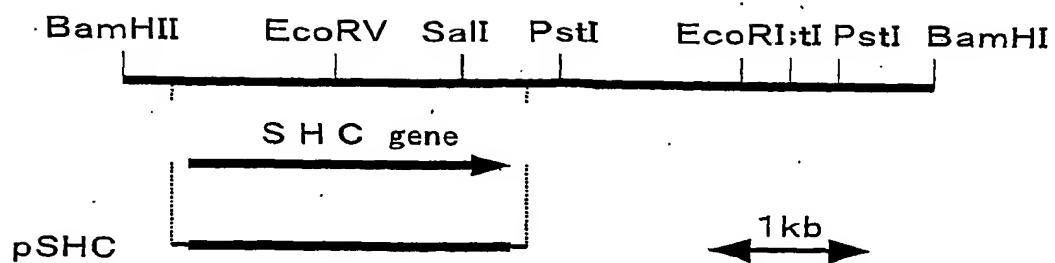


図 2

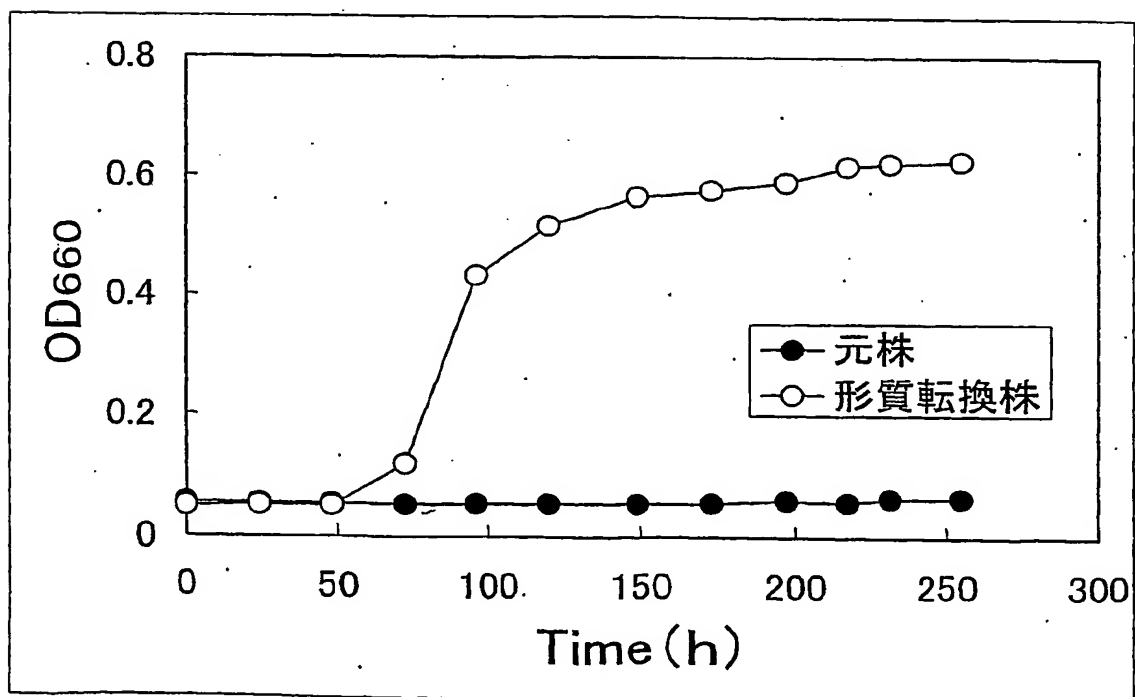
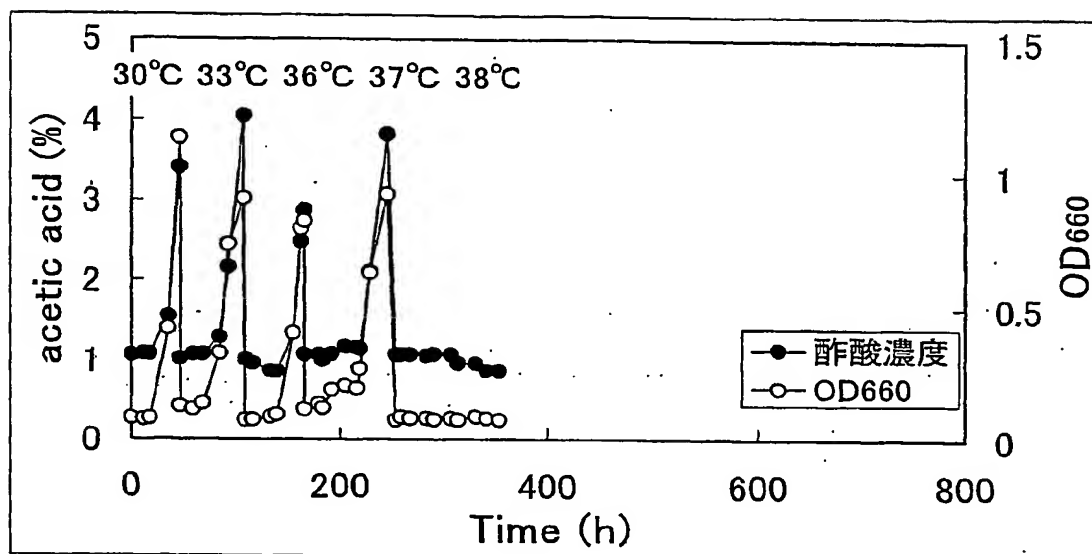
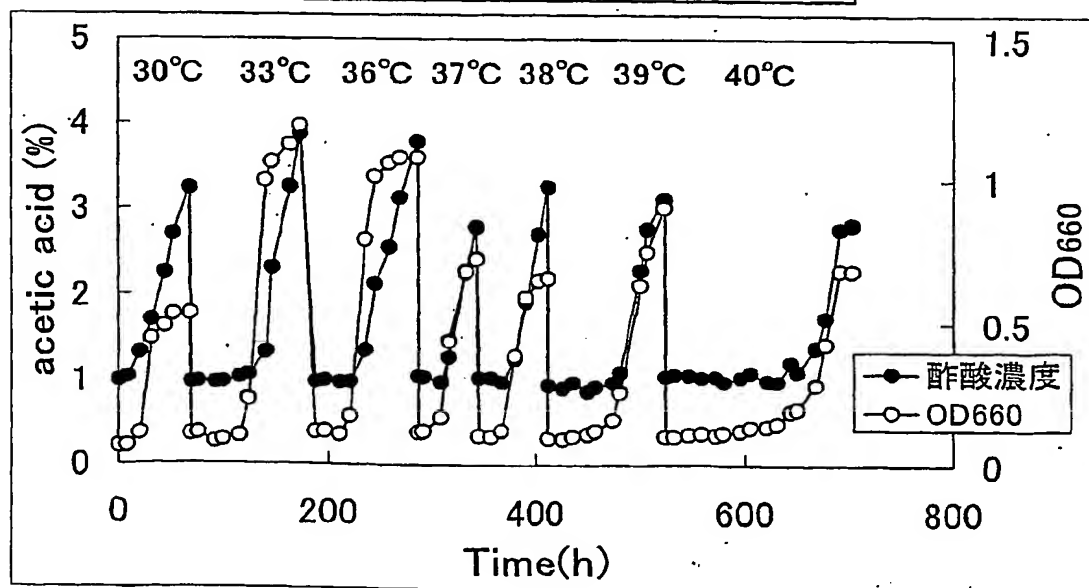


図 3

## 元株の発酵経過



## 形質転換株株の発酵経過



4

MetMetAlaLysArgThrGluThrAlaThr	ValThrArgProArgArgThrThrProSer	20
ThrArgLysAlaAlaThrProLysAlaAla	LeuAspAlaProLeuAspGlnAlaGluLeu	40
AspGlnAlaValThrArgAlaHisAlaAla	LeuGlyGlyArgGlnAlaAspAspGlyHis	60
TrpValPheAspLeuGluAlaAspAlaThr	IleProAlaGluTyrValLeuLeuGluHis	80
TyrLeuAsnArgIleAspProAspLeuGlu	GlnArgIleGlyIleTyrLeuArgArgIle	100
GlnGlyAspHisGlyGlyTrpProLeuTyr	GlnAspGlyThrPheAspLeuSerAlaSer	120
VallLysAlaTyrPheAlaLeuLysAlaIle	GlyAspSerValHisAlaProHisMetVal	140
ArgAlaArgHisAlaIleLeuAspTyrGly	GlyAlaGluArgThrAsnValPheThrArg	160
IleGlnLeuAlaLeuPheGlyAspValPro	TrpGluAlaAlaProValMetProValGlu	180
IleMetLeuLeuProArgArgAlaLeuPhe	SerValTrpAsnMetSerTyrTrpSerArg	200
ThrValIleAlaProLeuLeuValLeuAla	AlaLeuArgProAlaAlaValAsnProArg	220
ArgValHisValHisGluLeuPheValThr	SerProGlyLysValArgAspTrpIleArg	240
GlyProTyrArgSerValTrpGlyHisVal	PheArgTyrAlaAspAlaMetLeuArgPro	260
AlaGluArgLeuIleProGluLysThrArg	ArgArgAlaIleLysAlaAlaValAspPhe	280
IleGluProArgLeuAsnGlyLeuAspGly	LeuGlyAlaIleTyrProAlaMetAlaAsn	300
ThrValMetMetPheArgAlaLeuGlyIle	SerAspGluAspProArgAlaLysAlaAla	320

図 5

TrpGluAlaValArgArgLeuLeuValAsn GlnGlyLysGluThrTyrCysGlnProCys	340
ValSerProValTrpAspThrGlyLeuAla GlyHisAlaMetIleGluAlaAlaSerGly	360
ProAspGlyIleAlaProGluGluThrLys GlnLysLeuAlaAlaAlaGlyArgTrpLeu	380
ArgGluArgGlnIleLeuAsnValArgGly AspTrpAlaValAsnArgProAspValArg	400
ProGlyGlyTrpAlaPheGlnTyrAlaAsn AspTyrTyrProAspValAspAspThrAla	420
ValValGlyMetLeuLeuHisArgAspGly AspProAlaAsnAlaAspAlaValAlaArg	440
AlaArgGluTrpIleIleGlyMetGlnGly SerAsnGlyGlyTrpGlyAlaPheAspVal	460
AspAspSerArgAspValLeuAsnHisIle ProPheAlaAspHisGlyAlaLeuLeuAsp	480
ProProThrAlaAspValThrAlaArgCys IleSerPheLeuAlaGlnLeuArgGlnVal	500
GluAspHisAlaThrIleGluArgGlyIle AlaTyrLeuArgArgGluGlnGluThrAsp	520
GlySerTrpPheGlyArgTrpGlyThrAsn TyrIleTyrGlyThrTrpSerValLeuCys	540
AlaLeuAsnAlaAlaGlyMetProHisAsp AspProMetIleIleArgAlaValAspTrp	560
LeuArgHisHisGlnArgAlaAspGlyGly TrpGlyGluGlyCysGluSerTyrGluGly	580
GlyMetHisGlyAspTyrLysGlnSerLeu ProSerGlnThrAlaTrpAlaValLeuGly	600
LeuMetAlaAlaGlyLeuArgAspAspPro AlaValAlaArgGlyIleAlaTrpLeuGly	620
ArgThrGlnGlyLysAsnGlyGluTrpLys GluGluProTyrAsnAlaValGlyPhePro	640
ArgValPheTyrLeuArgTyrHisGlyTyr ArgGlnPhePheProLeuLeuAlaLeuSer	660
ArgTyrArgAsnMetGlnIleGlyAsnThr GlyArgValGlyTyrGlyPhe	677

図 6

5 ' -AGGAA TTCGTGACCACACGGGGAATATGGA - 3 '

図 7

5 ' -GCATTGGATCCGTATCAGAAGCCGTAGCCA - 3 '

## SEQUENCE LISTING

- <110> Mitsukan Group Corporation
- <120> Structural gene coding for squalene-hopene cyclase in acetic acid bacteria, acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants.
- <130> 6677
- <141> 2003-3-7
- <160> 4
- <210> 1
- <211> 2679
- <212> DNA
- <213> *Gluconacetobacter entanii*
- <400> 1

```

ggatcctgtc ggtcacggtc agcgccgcca accgctacgc cagcgagac cttgatgaac   60
ttggggccat catctggaac gaagtcgcgc ccgcgatcga cccggccgcg acggtcccc   120
tgccggtcgc catgccgcgc ctgcgtatcg tgcgtgaaaa acgcgcgacc ttgccgcaa   180
ccgtgcagca ggaccgcctg cggcccgcca tgcggaccat ggcgccaac ctgctgctgg   240
ccggggactg gacggccacg ggactgcccg ccacaatcga gggcgcgatc aggtcaggcc   300
atgccgcggc acaggctgtc catgccgcgc ggggtatgcc cggccgaccg aatgatgat   360
gtacggatct gcaacaggcc cccgtgacca cagggggaat atggaatgat ggcaaagaga   420
accgagaccg cgaccgttac ccgtccccgc aggacgaccc cctccaccgc caaggccgcc   480
acgccgaagg cggcgctgga cgccccgctg gatcaggccg aactggatca ggccgtgacc   540
cgtgcgcatg cggcactggg cgggcggcag gcggatgacg ggcactgggt cttgatctt   600
gaggccgatg ccaccatccc ggcggaatac gtgctgctgg aacactacct gaaccgatt   660
gaccggatc tggaacagcg gatcggcata tacctgcgcc gtatccaggg ggaccatggc   720
ggttgccgcg tgtatcagga cggcacgttc gacctgtcgg cttcgggtcaa ggcgtatatt   780
gccctcaagg cgattggcga cagcgtgcat gcgccgcaca tgggtgcgcgc acgccatgcc   840
atcctggact atggcggggc ggaacggacc aatgtgttca cccgcatcca gtttgcctg   900
tttggatgat tgccgtggga agccgcccc gtcatgccgg tcgagatcat gctgtgccg   960

```

cgcagggcgc tgttctcggg atggaacatg tcgtactggg cgcgcacggg gatcgcgcca 1020  
 ctgctgggtg tggcagcact ccgtcccgcg gcggtcaatc cgcgccgggt gcatgtgcac 1080  
 gaactgttcg tgacatcgcc cggaaaggta cgggactgga ttgcggggcc ataccgtcc 1140  
 gtctgggggc atgtgttcgg gtatgcggat gcgatgctgc ggcccgtga acgcctgatc 1200  
 cccgaaaaga cccgacgccg ggccataaag gcggcggtcg atttcattga accgcgcctg 1260  
 aacgggctgg acggtctggg ggccatctat ccgccatgg ccaacacggg catgatgttc 1320  
 cgcgcgctgg ggatatcgga cgaagaccg cgtgcaaagg ccgcgtggga ggcagtaagg 1380  
 cgctgtctgg tcaatcaggg caaggaaacc tactgccagc cctgcgtctc tcccgtatgg 1440  
 gataccggcc ttgccggta tgccatgatt gaggccgcac ccggtcccga cggcatcgcg 1500  
 ccggaggaga cgaagcagaa actggcggcc gcaggcagat ggctgcgtga accccagatc 1560  
 ctgaacgtca ggggcgactg ggccgtcaac cgccccgatg tccgccccgg cgggtggggc 1620  
 ttccagtacg ccaatgacta ttacccgat gtggatgata ccgcgttgt cggcatgctg 1680  
 ctgcatcgcg atggcgacc ggccaatgcg gatgcgggtg ccgcgcgcg ggaatggatc 1740  
 atcgcatgc agggcagcaa tggcggctgg gcgcggtcg atgttgataa cagccgcgac 1800  
 gtgtcaacc atattccctt tgccgacct ggcgactgc tcgaccgcc aacggcggat 1860  
 gtgacggcg gctgcatttc ctctctcgcg cagctgcgtc aggtcgagga ccatgccacg 1920  
 atcgaacgcg gtatgccta tctgcgcagg gagcaggaaa cggacggatc gtggttcggg 1980  
 cgctggggca ccaactacat ctatggcacg tggccgttc tgtgcgcgt caatgccgcc 2040  
 gggatgccgc atgacgatcc catgatcatc cgcgcggtcg actggctgcg ccaccaccag 2100  
 cgcgccgatg gcggctgggg tgagggtgt gaaagtatg aaggcgggat gcatggcgat 2160  
 tataaacaga gcctgccatc ccagaccgca tgggccgttc tgggcctgat ggcggctggc 2220  
 ctgcgtgatg atcccgcctt ggcgctggc attgcctggc tgggtcgac gcaggggaaa 2280  
 aatggcgaat ggaaggaaga accgtataac gccgtaggt tcccagggt gttttacctg 2340  
 cggatccatg gctaccgtca gttttcccg ctgctggccc tgtcgcgta ccggaacatg 2400  
 cagatcgga ataccggccg tgttggtac ggcttctgat acggggggaa tgcttacgat 2460  
 gtccaacagt gtatctgccc cccggtttc ccgactgggt atcgtggtgg ggatggagc 2520  
 ggagccgcc tgatccgtcc ctctctgccc acggccggt tgggctgag tggggcgacc 2580  
 ctgtccgtg cgcggcagc ggtgctcgac ctgctggaaa gcggggtgga tgcgtgctg 2640  
 tccttgggc tggcggcggg gctggaccg gcgctgcag 2679

<210> 2  
 <211> 677  
 <212> PRT  
 <213> Gluconacetobacter entanii  
 <400> 2

Met Met Ala Lys Arg Thr Glu Thr Ala Thr Val Thr Arg Pro Arg Arg  
 5 10 15  
 Thr Thr Pro Ser Thr Arg Lys Ala Ala Thr Pro Lys Ala Ala Leu Asp  
 20 25 30  
 Ala Pro Leu Asp Gln Ala Glu Leu Asp Gln Ala Val Thr Arg Ala His  
 35 40 45  
 Ala Ala Leu Gly Gly Arg Gln Ala Asp Asp Gly His Trp Val Phe Asp  
 50 55 60  
 Leu Glu Ala Asp Ala Thr Ile Pro Ala Glu Tyr Val Leu Leu Glu His  
 65 70 75 80  
 Tyr Leu Asn Arg Ile Asp Pro Asp Leu Glu Gln Arg Ile Gly Ile Tyr  
 85 90 95  
 Leu Arg Arg Ile Gln Gly Asp His Gly Gly Trp Pro Leu Tyr Gln Asp  
 100 105 110  
 Gly Thr Phe Asp Leu Ser Ala Ser Val Lys Ala Tyr Phe Ala Leu Lys  
 115 120 125  
 Ala Ile Gly Asp Ser Val His Ala Pro His Met Val Arg Ala Arg His  
 130 135 140  
 Ala Ile Leu Asp Tyr Gly Gly Ala Glu Arg Thr Asn Val Phe Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Ile Gln Leu Ala Leu Phe Gly Asp Val Pro Trp Glu Ala Ala Pro Val  
 165 170 175  
 Met Pro Val Glu Ile Met Leu Leu Pro Arg Arg Ala Leu Phe Ser Val  
 180 185 190



Trp Asn Met Ser Tyr Trp Ser Arg Thr Val Ile Ala Pro Leu Leu Val  
 195 200 205  
 Leu Ala Ala Leu Arg Pro Ala Ala Val Asn Pro Arg Arg Val His Val  
 210 215 220  
 His Glu Leu Phe Val Thr Ser Pro Gly Lys Val Arg Asp Trp Ile Arg  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Tyr Arg Ser Val Trp Gly His Val Phe Arg Tyr Ala Asp Ala  
 245 250 255  
 Met Leu Arg Pro Ala Glu Arg Leu Ile Pro Glu Lys Thr Arg Arg Arg  
 260 265 270  
 Ala Ile Lys Ala Ala Val Asp Phe Ile Glu Pro Arg Leu Asn Gly Leu  
 275 280 285  
 Asp Gly Leu Gly Ala Ile Tyr Pro Ala Met Ala Asn Thr Val Met Met  
 290 295 300  
 Phe Arg Ala Leu Gly Ile Ser Asp Glu Asp Pro Arg Ala Lys Ala Ala  
 305 310 315 320  
 Trp Glu Ala Val Arg Arg Leu Leu Val Asn Gln Gly Lys Glu Thr Tyr  
 325 330 335  
 Cys Gln Pro Cys Val Ser Pro Val Trp Asp Thr Gly Leu Ala Gly His  
 340 345 350  
 Ala Met Ile Glu Ala Ala Ser Gly Pro Asp Gly Ile Ala Pro Glu Glu  
 355 360 365  
 Thr Lys Gln Lys Leu Ala Ala Ala Gly Arg Trp Leu Arg Glu Arg Gln  
 370 375 380  
 Ile Leu Asn Val Arg Gly Asp Trp Ala Val Asn Arg Pro Asp Val Arg  
 385 390 395 400  
 Pro Gly Gly Trp Ala Phe Gln Tyr Ala Asn Asp Tyr Tyr Pro Asp Val  
 405 410 415  
 Asp Asp Thr Ala Val Val Gly Met Leu Leu His Arg Asp Gly Asp Pro

420	425	430	
Ala Asn Ala Asp Ala Val Ala Arg Ala Arg Glu Trp Ile Ile Gly Met			
435	440	445	
Gln Gly Ser Asn Gly Gly Trp Gly Ala Phe Asp Val Asp Asn Ser Arg			
450	455	460	
Asp Val Leu Asn His Ile Pro Phe Ala Asp His Gly Ala Leu Leu Asp			
465	470	475	480
Pro Pro Thr Ala Asp Val Thr Ala Arg Cys Ile Ser Phe Leu Ala Gln			
485	490	495	
Leu Arg Gln Val Glu Asp His Ala Thr Ile Glu Arg Gly Ile Ala Tyr			
500	505	510	
Leu Arg Arg Glu Gln Glu Thr Asp Gly Ser Trp Phe Gly Arg Trp Gly			
515	520	525	
Thr Asn Tyr Ile Tyr Gly Thr Trp Ser Val Leu Cys Ala Leu Asn Ala			
530	535	540	
Ala Gly Met Pro His Asp Asp Pro Met Ile Ile Arg Ala Val Asp Trp			
545	550	555	560
Leu Arg His His Gln Arg Ala Asp Gly Gly Trp Gly Glu Gly Cys Glu			
565	570	575	
Ser Tyr Glu Gly Gly Met His Gly Asp Tyr Lys Gln Ser Leu Pro Ser			
580	585	590	
Gln Thr Ala Trp Ala Val Leu Gly Leu Met Ala Ala Gly Leu Arg Asp			
595	600	605	
Asp Pro Ala Val Ala Arg Gly Ile Ala Trp Leu Gly Arg Thr Gln Gly			
610	615	620	
Lys Asn Gly Glu Trp Lys Glu Glu Pro Tyr Asn Ala Val Gly Phe Pro			
625	630	635	640
Arg Val Phe Tyr Leu Arg Tyr His Gly Tyr Arg Gln Phe Phe Pro Leu			
645	650	655	

Leu Ala Leu Ser Arg Tyr Arg Asn Met Gln Ile Gly Asn Thr Gly Arg

660

665

670

Val Gly Tyr Gly Phe

675

677

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

aggaattcgt gaccacacgg ggaatatgga

30

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

gcattggatc cgtatcagaa gccgtagcca

30

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02731

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS),  
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FREIBERG, C. et al., Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. Nature., (1997), Vol.387, No.6631, pages 394 to 401	1-7
A	REIPEN, IG. et al., Zymomonas mobilis squalene-hopene cyclase gene (shc): cloning, DNA sequence analysis, and expression in Escherichia coli. Microbiology., (1995), Vol.141, No.1, pages 155 to 161	1-7
A	TIPPELT, A. et al., Squalene-hopene cyclase from Methylococcus capsulatus (Bath): a bacterium producing hopanoids and steroids. Biochem.Biophys.Acta., (1998), Vol.1391, No.2, pages 223 to 232	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 27 June, 2003 (27.06.03)	Date of mailing of the international search report 15 July, 2003 (15.07.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02731

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FUKAYA, M. et al., The aarC gene responsible for acetic acid Assimilation confers acetic acid resistance on Acetobacter aceti., J.Ferment. Bioeng., (1993), Vol.76, No.4, pages 270 to 275	1-7
A	SCHULLER, G. et al., Gluconacetobacter entanii sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. Int.J.Syst.Evol.Microbiol., (2000), Vol.50, No.6, pages 2013 to 2020	1-7
A	JP 3-219878 A (NAKANO VINEGAR CO., LTD.), 27 September, 1991 (27.09.91), Full text (Family: none)	1-7
A	EP 332120 A (NAKANO VINEGAR CO., LTD.), 13 September, 1989 (13.09.89), Full text & JP 2-2364 A & DE 68921354 E & ES 2070864 T3 & US 5914257 A	1-7
A	JP 60-009489 A (Teruhiko BEPPU), 18 January, 1985 (18.01.85), Full text (Family: none)	1-7
A	JP 60-009488 A (Teruhiko BEPPU), 18 January, 1985 (18.01.85), Full text (Family: none)	1-7
A	JP 5-199887 A (NAKANO VINEGAR CO., LTD.), 10 August, 1993 (10.08.93), Full text (Family: none)	1-7
A	JP 60-180581 A (NAKANO VINEGAR CO., LTD.), 14 September, 1985 (14.09.85), Full text & US 4654306 A	1-7

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/02731

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C07K 14/195, C12N 1/21, C12J 1/04

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N 15/09, C07K 14/195, C12N 1/21, C12J 1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTplus (JOIS), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	FREIBERG, C. et al., Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. Nature. (1997) Vol. 387, No. 6631, p. 394-401	1-7
A	REIPEN, IG. et al., Zymomonas mobilis squalene-hopene cyclase gene (shc): cloning, DNA sequence analysis, and expression in Escherichia coli. Microbiology. (1995) Vol. 141, No. 1, p. 155-161	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.06.03

国際調査報告の発送日

15.07.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹

4N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	TIPPELT, A. ET AL., Squalene-hopene cyclase from Methylococcus capsulatus (Bath): a bacterium producing hopanoids and steroids. Biochim Biophys Acta. (1998) Vol. 1391, No. 2, p. 223-232	1-7
A	FUKAYA, M. et al., The aarC gene responsible for acetic acid Assimilation confers acetic acid resistance on Acetobacter aceti. J Ferment Bioeng. (1993) Vol. 76, No. 4, p. 270-275	1-7
A	SCHULLER, G. et al., Gluconacetobacter entanii sp. nov., isolated from submerged high-acid industrial vinegar fermentations. Int J Syst Evol Microbiol. (2000) Vol. 50, No. 6, p. 2013-2020	1-7
A	JP 3-219878 A(株式会社中埜酢店)1991.09.27, 全文 (ファミリーなし)	1-7
A	EP 332120 A(NAKANO VINEGAR CO LTD)1989.09.13, 全文 & JP 2-2364 A & DE 68921354 E & ES 2070864 T3 & US 5914257 A	1-7
A	JP 60-009489 A(別府輝彦)1985.01.18, 全文 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 60-009488 A(別府輝彦)1985.01.18, 全文 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 5-199887 A(株式会社中埜酢店)1993.08.10, 全文 (ファミリーなし)	1-7
A	JP 60-180581 A(株式会社中埜酢店)1985.09.14, 全文 & US 4654306 A	1-7